Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 19, No. 5, Dec.-Jan. 2023, p. 745-755

Investigating of Tomato Pastes Microbial Contamination in Iran and Isolation and Identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by PCR Method

M. Atharinia[1]* N. Zonourian[2], S. Davarzani[3]

1- Faculty Member of Food Microbiology, Microbiology and Biology Research Group, Food Technology and Agricultural Prouducts Research Center, Standard Research Institute, Iran
(*- Corresponding Author Email: atharinia_m@standard.ac.ir)
2- Kermanshah Standard General Office
3- Expert of Food Microbiology, Microbiology and Biology Research Group, Food Technology and Agricultural Prouducts Research Center, Standard Research Institute, Iran

Received: 2022.12.11
Revised: 2023.02.06
Accepted: 2023.02.12
Available Online: 2023.02.19

How to cite this article:
Atharinia, M., Zonourian, N., & Davarzani, S. (2023). Investigating of tomato pastes microbial contamination in Iran and Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by PCR method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 19*(5), 745-755. (In Persian with English abstract).
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79840.1222

Introduction

Tomato paste is one of the processed tomato products that has a long shelf life and is used as an important food ingredient all over the world. According to global statistics, Iran is among the top ten producers of tomato paste in the world, Iran ranks fourth to fifth in the world in the field of aseptic paste production. Alicyclobacillus bacteria are considered as a risk for pasteurized acidic food industries. These bacteria enter the product through soil-contaminated fruits, production equipment of the factories and finally produce metabolites such as guaiacol, causing an unpleasant taste in the product.

Materials and Methods

In order to investigate the microbial contamination of canned tomato paste in the country, 46 samples of canned tomato paste in the amount of 184 cans of 800 grams were purchased from the market. Regarding the purchase of samples from the market, we tried to buy a different production date and production series for each sample (approximately 4 cans for each brand from each production series). The purchased samples were sent to the Microbiology Department of the Standard Research Institute laboratory for microbiology tests. At the same time, the culture media of thermophilic bacteria (Orange Serum Agar, Thermoacidurans Agar from 4 available brands) were tested for performance control. The canned tomato paste samples were incubated at 30°C ± 1°C for 14 days and 55°C ± 1°C for 7 days.

Results and Discussion

The contents of both examined samples were tested separately for thermophilic bacteria, mesophilic bacteria, mold and yeast. Out of the 46 samples prepared with different production dates and production series, which were 46 cans of tomato paste, 28 samples were positive in terms of contamination with thermophilic bacteria. According to the number of contaminated samples, it was found that 60.86% of the samples were contaminated. Colonies grown on Thermoacidurans Agar medium were examined morphologically. For further investigations, gram staining was performed. All the stained colonies morphologically showed the form of gram-positive rod-shaped bacilli. Biochemical tests including catalase and oxidase were performed to identify *Alicyclobacillus* species. All the grown colonies were

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79840.1222

catalase positive and oxidase negative. The final identification of the species was done by performing molecular tests based on specific primers designed from *Alicyclobacillus* gene. These tests were performed in three stages: genomic DNA extraction, polymerase chain reaction and electrophoresis. Using the PCR method, the grown colonies were analyzed for two types of bacteria, *Alicyclobacillus acidocaldarius* and *Bacillus coagulans*. According to the results obtained from sequencing with designed primers in the NCBI database, it showed 100% similarity with the registered sequences, which are all different strains of the *Alicyclobacillus acidocaldarius* species. None of the colonies were detected as *Bacillus coagulans* species. Since *Alicyclobacillus acidocaldarius* was isolated from soil for the first time, the presence of these bacteria in the product indicates the contamination of raw materials with soil.

Conclusion

In this research, the presence of *Alicyclobacillus* bacteria in canned tomato paste was confirmed. Due to the high heat resistance of this bacteria, there is a possibility of the presence of *Alicyclobacillus* in the all stages of tomato paste production, which have entered the product through the soil, and 95°C ± 3°C pasteurization temperature in 30 minutes is not effective in removing this bacteria completely. Most acidophilus thermophilic bacteria, such as *Alicyclobacillus* family, are not pathogenic bacteria. Their presence in food may make the food taste bad or smelly, but it does not pose a risk to the health of the consumer. Therefore, in order to reduce the risk of spoilage and to prevent the growth of bacterial spores in the product, it is essential not to expose the product to high temperatures for a long time. It is also necessary to perform rapid cooling after heat treatment and keep the product at a temperature below 30°C.

Acknowledgement

This article is the result of a common research project of Microbiology and Biology Research Group of Standard Research Institute and Kermanshah Standard Regional Research Group. We hereby thank and appreciate the cooperation of the microbiology research group of the Standard Research Institute and the Kermanshah General Directorate of Standards. We are also very grateful to Rogin Talk Company as the employer of this project.

Keywords: *Alicyclobacillus acidocaldarius*, PCR, Thermophilic bacteria, Tomato paste

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۲ ص. ۷۵۵-۷۴۵

بررسی آلودگی میکروبی کنسروهای رب گوجه‌فرنگی در ایران و جداسازی و شناسایی *Alicyclobacillus acidocaldarius* به روش *PCR*

معصومه اطهری نیا[1]*- نسرین ذوالنوریان[2]- ساره داورزنی[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۳

چکیده

رب گوجه‌فرنگی یکی از فرآورده‌های فرآوری شده گوجه‌فرنگی است که ماندگاری طولانی دارد و به‌عنوان یک ماده غذایی مهم در سراسر جهان استفاده می‌شود. بر اساس آمارهای جهانی، ایران جزو ده تولیدکننده برتر رب گوجه‌فرنگی در جهان است، ایران در زمینه تولید رب گوجه‌فرنگی در رتبه چهارم تا پنجم جهان قرار دارد. باکتری Alicyclobacillus به‌عنوان یک خطر برای صنایع غذایی پاستوریزه اسیدی در نظر گرفته می‌شود. این باکتری‌ها از طریق میوه‌های آلوده به خاک، تجهیزات تولید کارخانه‌ها وارد محصول شده و در نهایت متابولیت‌هایی مانند گایاکول تولید می‌کند و باعث ایجاد طعم نامطبوع در محصول می‌شود. به‌منظور بررسی آلودگی میکروبی کنسروهای رب گوجه‌فرنگی در کشور، ۴۶ نمونه کنسرو رب گوجه فرنگی به میزان ۱۸۴ قوطی ۸۰۰ گرمی از بازار خریداری شد. در خصوص خرید نمونه از بازار، سعی شد برای هر نمونه تاریخ تولید و سری ساخت متفاوتی خریداری شود (۴ قوطی کنسرو برای هر برند از هر سری تولید). نمونه‌های خریداری شده برای انجام آزمایش‌های مربوطه به آزمایشگاه گروه میکروبیولوژی پژوهشگاه استاندارد ارسال شد. هم‌زمان، محیط‌کشت‌های TAA, OSA برای کنترل عملکرد مورد آزمون قرار گرفتند. نمونه‌های کنسرو رب گوجه‌فرنگی در دمای ۳۰°C ±۱°C به مدت ۱۴ روز و دمای ۵۵° C±۱°C به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند. محتویات هر دو نمونه آزمونه به‌طور جداگانه برای باکتری‌های ترموفیل، باکتری‌های مزوفیل، کپک و مخمر مورد آزمون قرار گرفتند. از ۴۶ نمونه تهیه شده با تاریخ‌های و سری‌های ساخت متفاوت، ۲۸ نمونه از نظر آلودگی به باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل مثبت بودند. با توجه به تعداد نمونه‌های آلوده مشخص شد که ۶۰٫۸۶ درصد از نمونه‌ها آلوده با باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل بودند. کلنی‌های رشدیافته روی محیط کشت TAA از نظر مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی‌های بیشتر رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. تمام کلنی‌های رنگ‌آمیزی شده از نظر مورفولوژیکی شکل باسیل‌های میله‌ای شکل گرم مثبت را نشان دادند. شناسایی گونه‌های *Alicyclobacillus* بوسیله آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز و اکسیداز انجام گرفت. تمام کلنی‌های رشد یافته کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند. شناسایی نهایی گونه با انجام آزمون‌های مولکولی بر اساس آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از ژن Alicyclobacillus انجام شد. این آزمون‌ها در سه مرحله استخراج DNA ژنومی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز انجام شد. با استفاده از روش PCR، کلنی‌های رشدیافته از نظر دو نوع باکتری *Alicyclobacillus acidocaldarius* و *Bacillus coagulans* مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی با آغازگرهای طراحی شده در پایگاه داده NCBI، شباهت ۱۰۰ درصدی با توالی‌های ثبت شده که همگی سویه‌های مختلف گونه *Alicyclobacillus acidocaldarius* هستند، نشان داد. هیچ‌یک از کلنی‌ها به‌عنوان گونه *Bacillus coagulans* شناسایی نشد. از آنجایی‌که باکتری *Alicyclobacillus acidocaldarius* برای اولین‌بار از خاک جدا شد، وجود این باکتری‌ها در محصول نشان‌دهنده آلودگی مواد اولیه به خاک است. در این تحقیق وجود باکتری آلیسایکلوباسیلوس در کنسرو رب گوجه‌فرنگی تایید شد. با توجه به مقاومت حرارتی بالای این باکتری، احتمال وجود باکتری‌های آلیسایکلوباسیلوس در تمامی مراحل تولید رب گوجه‌فرنگی که از طریق خاک وارد محصول شده‌اند، وجود دارد و دمای پاستوریزاسیون (C° ۳± C° ۹۵ در ۳۰ دقیقه) در از بین بردن کامل این باکتری مؤثر نیست. اکثر باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل مانند خانواده Alicyclobacillus باکتری‌های بیماری‌زا نیستند و وجود آنها در غذا ممکن است طعم بد یا بدبوی غذا را ایجاد کند، اما خطری برای سلامت مصرف کننده ندارد.

۱- هیأت علمی گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیولوژی، پژوهشکده صنایع غذایی و فرآورده‌های کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: atharinia_m@standard.ac.ir)
۲- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، اداره کل استاندارد استان کرمانشاه
۳- کارشناس مسئول گروه میکروبیولوژی و بیولوژی، پژوهشکده صنایع غذایی و فرآورده های کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد ایران
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.79840.1222

واژه‌های کلیدی: باکتری ترموفیل، رب گوجه‌فرنگی، *Alicyclobacillus acidocaldarius*، PCR

مقدمه

رب‌گوجه‌فرنگی یکی از محصولات فرآوری شده گوجه‌فرنگی است که ماندگاری بالایی دارد و به‌عنوان یک ماده غذایی مهم در سراسر جهان استفاده می‌شود. شیوع فساد در رب، تفاله و آب گوجه‌فرنگی تقریباً هر سال رخ می‌دهد. ارگانیسم ایجاد کننده این نوع فساد برای اولین بار توسط Berry در سال ۱۹۳۱ جداسازی و به‌عنوان *B. thermoaciduransِ* نامگذاری شد (Berry, 1933).

در سال ۱۹۸۶ گزارشی مبنی بر فساد آب سیب پاستوریزه صنعتی در آلمان منتشر شد که در طی آن مشخص شد باکتری‌های ترموفیل در این فساد نقش دارند. پژوهش‌های بعدی انجام شده روی این میکروارگانیسم‌ها مشخص کرد که امکان زنده‌مانی آنها بعد از پاستوریزاسیون وجود دارد (Splittstoesser, 1998). گستره دمایی ۲۰°C-۷۰°C و pH حدود ۲/۵ برای رشد این باکتری ها مناسب می باشد (Karavaiko *et al*., 2005).

این میکروارگانیسم‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۶۷ در ژاپن از چشمه‌های آب گرم جدا شدند (Uchino, 1967). اولین گزارش از جداسازی اسپور باکتری‌های ترمواسیدوفیل از غذاهای اسیدی فاسد تیمار شده با حرارت، در سال ۱۹۸۲ در آلمان اعلام شد (Cerny, 2018). این میکروارگانیسم‌ها ابتدا در جنس *Bacillus* قرار گرفتند، اما در سال ۱۹۹۲ ایجاد یک جنس جدید به نام *Alicyclobacillus* پیشنهاد شد که شامل گونه‌های *Alicyclobacillus acidocaldarius*، *acidoterrestris* *Alicyclobacillus cycloheptanicus* می‌باشد (Berkeley, 1994). این جنس شامل باکتری‌های گرمادوست و اسیددوست، گرم مثبت، هوازی، غیربیماری‌زا و تولیدکننده اندوسپور می‌باشد (Chang and Kang, 2004). گونه‌های *Alicyclobacillus* به عنوان باسیل های گرم مثبت، گرما دوست، اسیدوفیل، تشکیل دهنده اسپور، دارای اسیدهای چرب حلقوی به‌عنوان جزء اصلی غشای سلولی مشخص می-شوند (Goto *et al*., 2007 ; Lee *et al*., 2010). اسپورها می‌توانند از عملیات حرارتی مرسوم مورد استفاده در فرآوری مواد غذایی محصولات اسیدی زنده بمانند و ترکیباتی مانند گایاکول (۲- متوکسی فنول) (Pettipher, 1997) و ۲،۶ – دیبروموفنول (Baumgart, 1997) تولید کنند که هر دو مسئول تشکیل بوی فنولیک یا ضدعفونی کننده در نوشیدنی‌های اسیدی هستند (Durak *et al*., 2010; Goto *et al*., 2008; Wang *et al*., 2013). منشأ اصلی این باکتری‌ها خاک می‌باشد و از طریق میوه‌های آلوده به خاکی که فرآیند شستشو را به‌خوبی سپری نکرده‌اند، به خط تولید و تجهیزات واحدهای تولیدی وارد می‌شوند (Chang and Kang, 2004). طی بررسی‌ها مشخص شده است که این باکتری‌ها بیماری‌زا نیستند ولی مواد حاصل از فعالیت زیستی آنها باعث تغییر طعم و بو همراه با رسوب یا بدون رسوب، تغییر رنگ محصول و ایجاد کدورت می‌شود. این امر باعث غیرقابل مصرف شدن محصول و خسارت به تولیدکنندگان می‌شود (Splittstoesser *et al*., 1998). آلیسایکلوباسیلوس‌ها در فعالیت آبی (a_w) بیشتر از ۰/۹ قادر به رشد هستند. همچنین این باکتری‌ها باعث متابولیزه کردن قندها بدون تولید گاز می‌شوند (Yokota *et al*., 2007). طی پژوهش‌های بیشتری که انجام شد گونه‌های *Alicyclobacillus* را در آب‌میوه‌های پاستوریزه، پالپ میوه‌ها، آب‌میوه‌های گازدار، آب ایزوتونیک و کنسرو گوجه‌فرنگی شناسایی کردند (Walls and Chuyate, 2000).

تشخیص فساد ناشی از این میکروارگانیسم دشوار است. وجود این باکتری در آب میوه طبیعی ممکن است تولید رسوب کم کند، ولی تولید گاز نمی‌کند. اغلب، تنها شواهد تغییر مزه دارویی یا فنلی در فرآورده است (Walls, 1998). کشف برخی از اندوسپورهای *Alicyclobacillus*، به‌عنوان تنها سلول‌های میکروبی موجود در محصولات فاسد شده، نشان می‌دهد که رشد میکروبی و متعاقب آن تشکیل متابولیت‌ها قبل از پاستوریزاسیون اتفاق افتاده است. جوانه‌زنی اسپور *Alicyclobacillus* تنها درصورتی رخ می‌دهد که شرایط محیطی مناسب ایجاد شود. به‌همین دلیل، موارد فساد تایید شده تعداد کمی است (Cocconi *et al*., 2018). با توجه مشاهده آلودگی‌های متعدد به باکتری‌های ترموفیل در کنسروهای رب گوجه‌فرنگی و مشکلات پیش آمده برای صنعت، پژوهش حاضر به‌منظور پایش و بررسی آلودگی میکروبی کنسروهای رب گوجه‌فرنگی تولید داخل کشور درتمامی برندها و احتمال شناسایی باکتری *acidocaldarius Alicyclobacillus* درآنها و تشخیص نهایی آن توسط آزمایش‌های مولکولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت و کنترل عملکرد آنها

در این پژوهش، محیط‌کشت‌های TAA[1] و OSB[2] از چهار برند Himedia، Q-Lab، Liofilchem و Ibresco خریداری شد. جهت بررسی صحت عملکرد و تعیین کارایی بهتر محیط کشت‌ها آزمون

1- Thermoacidurans agar
2- Orang Serum Broth

کنترل عملکرد به روش کیفی تک لوله‌ای انجام شد (ISO 11133, 2014).

به‌همین منظور از ۵ سویه *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* جهت کنترل کیفی محیط کشت OSB، از سوش‌های *Bacillus coagulans*، *Leuconostoc mesenteroids* جهت کنترل کیفی محیط کشت TAA و از سوش‌های *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus brasilliensis* جهت کنترل کیفی محیط کشت SDA استفاده شد. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه گذاری محیط‌های کشت از لحاظ عدم رشد، رشد ضعیف، رشد خوب بررسی شدند. برای آزمون قابلیت انتخابی از *E.coli* ATTC 11778 با نتیجه مهار کامل استفاده شد.

روش آزمون

۴۶ نمونه کنسرو رب گوجه‌فرنگی به تعداد ۱۸۴ قوطی ۸۰۰ گرمی از سطح بازار خریداری شد. سپس نمونه‌ها در دو دمای ۳۰°C ±۱°C به مدت ۱۴روز و دمای ۵۵°C±۱°C به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شد (INSO 2326, 2016). پس از پایان دوره گرمخانه‌گذاری و رسیدن دمای نمونه‌ها به دمای محیط، وضع ظاهری کلیه نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده از نظر وجود نشتی و یا بادکردگی بررسی شد. همچنین تمامی نمونه‌ها از لحاظ pH فرآورده مورد بررسی قرار گرفت.

جستجوی باکتری‌های مقاوم به اسید مزوفیل

۲ میلی‌لیتر از هر آزمایه مخلوط شده به دو لوله، (هر لوله ۲ ml) دارای محیط‌کشت OSB (از هر ۴ برند محیط کشت، برای هر نمونه ۸ لوله) افزوده شد. پس از مخلوط‌کردن محیط‌کشت و نمونه، لوله‌ها در دمای ۳۰°C ± ۱°C به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان دوره گرمخانه‌گذاری با توجه به اینکه رب گوجه‌فرنگی باعث بوجود آمدن کدورت در محیط‌کشت می‌شود، بنابراین برای تمامی لوله ها، با استفاده از لوپ سترون بر روی محیط‌کشت OSA [1] کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۰°C ± ۱°C به مدت ۴۸h گرمخانه‌گذاری شد. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها از نظر رشد کلنی بررسی شد (INSO 2326, 2016).

جستجوی باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل

۲ میلی‌لیتر از هر آزمایه مخلوط شده به دو لوله، (هر لوله ۲ ml) دارای محیط‌کشت OSB (از هر ۴ برند محیط کشت، برای هر نمونه ۸ لوله) افزوده شد. پس از مخلوط‌کردن محیط‌کشت و نمونه، لوله‌ها در دمای ۵۵°C ±۱°C به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه‌گذاری شدند. پس از پایان دوره گرمخانه‌گذاری بر روی محیط‌کشت TAA (هر ۴ برند، برای هر نمونه ۸ پلیت) کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۵۵°C±۱°C به مدت ۴۸h گرمخانه‌گذاری شد. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی شد (INSO 2326, 2016)..

جستجوی کپک و مخمر

۲ میلی‌لیتر از هر آزمایه مخلوط‌شده به دو لوله، (هر لوله ۲ ml) دارای محیط‌کشت OSB افزوده شد. پس از مخلوط کردن محیط‌کشت و نمونه، لوله‌ها در دمای ۲۵°C±۱°C به مدت ۳ تا ۵ روز گرمخانه گذاری شد. پس از پایان دوره گرمخانه‌گذاری با توجه به اینکه رب گوجه‌فرنگی باعث بوجود آمدن کدورت در محیط‌کشت می‌شود بنابراین برای تمامی لوله‌ها، با استفاده از لوپ سترون بر روی محیط‌کشت SDA [2] کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۲۵°C ±۱°C به مدت ۵ روز گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها را از نظر رشد کلنی بررسی شد (INSO 2326, 2016).

شناسایی به روش مولکولی

شناسایی نهایی گونه‌ها با انجام آزمون‌های مولکولی براساس پرایمر اختصاصی طراحی شده با Primer3 Input (version 0.4.0) طبق جدول ۱ انجام شد. این آزمایش‌ها درسه مرحله استخراج DNA ، انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز انجام شد (Groenewald *et al*., 2009). فرمول مواد مورد استفاده برای واکنش PCR در جدول ۲ آورده شده است. برنامه دمایی استفاده شده برای PCR در جدول ۳ آورده شده است. الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد انجام شد. با استفاده از روش PCR، کلنی‌های رشد کرده از لحاظ تشخیص برای دوگونه باکتری *Alicyclobacillus acidocaldarius* و *Bacillus coagulans* مورد بررسی قرار گرفتند (شکل‌های ۱ و ۲). آزمایش‌های مولکولی گونه رفرنس *Alicyclobacillus* همزمان انجام شد و پس از به‌دست آوردن باند قابل قبول محصولات PCR، توالی یابی و عملیات BLAST در NCBI صورت گرفت و شناسایی نمونه‌ها تا مرحله جنس و گونه انجام شد.

1- Orang Serum Agar

2- Sabouraud Dextrose Agar

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی طراحی شده
Table 1- Designed specific primers

آغازگر Primer	توالی‌های نوکلوتیدی Nucleotide Sequences	اندازه توالی Sequence Size
Alicy. Acidocaldarius -F	5′ GTTGGACCGGCAGATCAC -3′	680
Alicy. Acidocaldarius -R	5′ GAGCGCCTTTTGAATGTACG -3′	680

جدول ۲- فرمول استفاده شده برای مخلوط واکنش PCR
Table 2- The formula used for the PCR reaction mixture

Ingredient ترکیبات	Conc. غلظت	Volume(μl) حجم
ddwater اب دوبار تقطیر	----------------------	4
Master mix مخلوط واکنش	2X	5
Primer F آغازگر F	10 μM	0.5
Primer R آغازگر R	10 μM	0.5
Template DNA تمپلت DNA		0
Sum مجموع		10

جدول ۳- برنامه دمایی استفاده شده
Table 3- Temperature program used

PCR program Temp(°C) برنامه دمایی PCR (°C)		Time زمان
Initial denaturation دناتوراسیون اولیه	95	3 دقیقه (min)
Denaturation دناتوراسیون	95	25 ثانیه (Secend)
Annealing آنلینگ	60	25 ثانیه (Secend)
Extension گسترش	72	25 ثانیه (Secend)
Number of Cycles تعداد چرخه	35	
Final extension گسترش نهایی	72	5 دقیقه (min)

تجزیه و تحلیل آماری

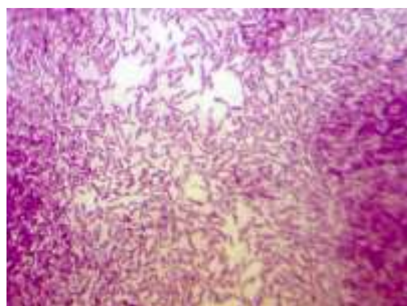
داده‌های به‌دست آمده از پژوهش توسط آزمون‌های آماری توصیفی و استنباطی در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. رسم نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ انجام شد.

نتایج و بحث

از تعداد ۴۶ نمونه تهیه شده با تاریخ تولید و سری ساخت‌های متفاوت، در مجموع تعداد ۱۸۴ قوطی کنسرو رب گوجه‌فرنگی، تعداد ۲۸ نمونه از لحاظ آلودگی به باکتری‌های مقاوم به اسید ترموفیل مثبت بودند. با توجه به تعداد نمونه‌های آلوده مشخص شد که ۶۰/۸۶ درصد از نمونه‌ها دارای آلودگی با باکتری های مقاوم به اسید ترموفیل هستند. هیچ یک از نمونه ها آلودگی به باکتری های مقاوم به اسید مزوفیل و کپک و مخمر را نشان ندادند.pH اندازه گیری شده تمامی نمونه‌ها بین ۴/۳ تا ۴ و در محدوده استاندارد فرآورده بود (INSO 761,2016).

بررسی مورفولوژیکی

کلنی‌های رشد کرده روی محیط‌کشت TAA از لحاظ مورفولوژیکی بررسی شدند. برای بررسی‌های بیشتر رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. تمامی کلنی‌های رنگ‌آمیزی شده از لحاظ مورفولوژیکی شکل باسیل‌های استوانه‌ای گرم مثبت (شکل ۱) را نشان دادند.

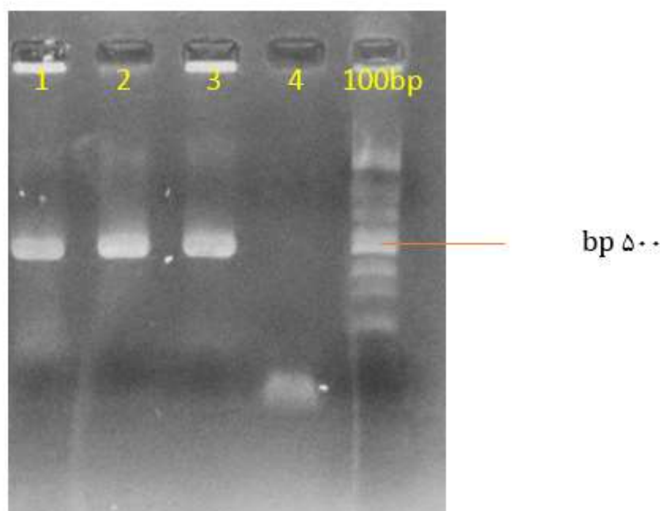


شکل ۱- باسیل‌های گرم مثبت استوانه‌ای مشاهده شده در رنگ‌آمیزی گرم
Fig. 1- Cylindrical Gram-positive bacilli observed in Gram staining

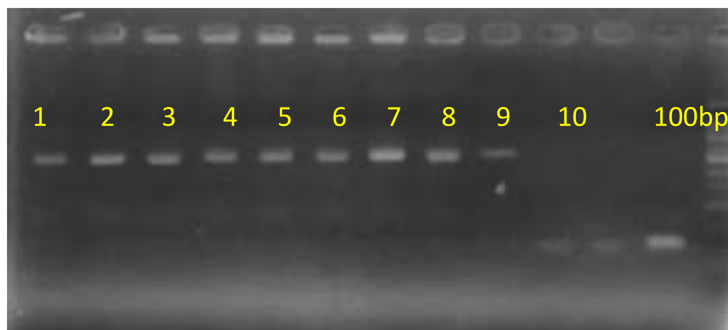
نتایج آزمون‌های مولکولی

طبق نتایج به‌دست آمده حاصل از توالی‌یابی با پرایمر طراحی شده در داده پایگاه NCBI، مشابهت ۱۰۰ درصد با توالی‌های ثبت شده را نشان داد (شکل ۳) که همگی سویه‌های مختلف از گونه باکتریایی *Alicyclobacillus acidocaldarius* می‌باشند. هیچ‌کدام از سویه‌ها گونه *Bacillus coagulans* تشخیص داده نشدند. (در نمونه‌های ۸۰ و ۲۵ کشت روی پلیت کلنی‌های تیپیک و مناسب مشاهده شد و در کشت مایع کدروت ناشی از رشد باکتری به‌صورت کاملاً مشخص و واضح به‌دست آمد (شکل ۲)، بنابراین به‌صورت تصادفی به‌عنوان نمونه‌های منتخب جهت انجام آزمون‌های مولکولی انتخاب شدند).

Alicy (541, 60)	
V. No. شماره باند	S.N. شماره نمونه
1	Colony 80 (1) کلنی ۸۰ (۱)
2	Liquid 80 (2) مایع ۸۰ (۲)
3	Colony 25(3) کلنی ۲۵(۳)
4	C- کنترل منفی



شکل ۲- باندهای به‌دست‌آمده در ژل الکتروفورز برای نمونه‌های منتخب ۸۰ و ۲۵، باند شماره ٤ کنترل منفی می‌باشد
Fig. 2- The bands obtained in electrophoresis gel for selected samples 80 and 25, band number 4 is the negative control



Alicy (541, 60)	
V. No. شماره باند	S.N. شماره نمونه
1	Colony 6 ، کلنی ۶
2	Colony 12، کلنی ۱۲
3	Colony 14، کلنی ۱۴
4	Colony 25، کلنی ۲۵
5	Colony 40، کلنی ۴۰
6	Colony 47، کلنی ۴۷
7	Colony 51، کلنی ۵۱
8	Colony 72، کلنی ۷۲
9	Colony 80، کلنی ۸۰
10	C-، کنترل منفی

شکل ۳- باندهای به‌دست‌آمده در ژل الکتروفورز برای نمونه‌های منتخب طبق جدول بالا، باند شماره ۱۰ کنترل منفی می‌باشد

Fig. 3- Bands obtained in gel electrophoresis for selected samples according to the table above, band number 10 is the negative control

نتایج کنترل عملکرد محیط‌کشت‌های OSB ،TAA

پس از بررسی پلیت‌های مربوط به محیط‌کشت OSB مشخص شد که دو برند Ibresco, Quelab بهترین کیفیت و برندهای HiMEDIA و Liofilchem در رده‌های بعدی قرار دارند. و پس از بررسی پلیت‌های مربوط به محیط‌کشت TAA مشخص شد که همگی محیط‌های کشت دارای کیفیت مناسب بودند.

بحث

باکتری‌های *Alicyclobacillus* به‌عنوان یک مخاطره برای صنایع غذاهای اسیدی پاستوریزه به‌شمار می‌آیند. این باکتری‌ها از طریق میوه‌های آلوده به خاک، به تجهیزات تولید کارخانه‌ها، در نهایت به محصول راه یافته و با تولید متابولیت‌هایی نظیر گایاکول باعث ایجاد طعم نامطلوب در محصول می‌شوند (Wisse, 1998). دمای پاستوریزه معمول نمی‌تواند این باکتری را از بین ببرد، بسته به نوع فرآورده، دمای نگهداری و تعداد اولیه باکتری در میلی‌لیتر، ایجاد طعم بد یا بوی نامطبوع می‌تواند در نتیجه تکثیر باکتری‌ها و تشکیل مواد از نوع فنول مانند گایاکول باشد (Baumgart, 2003). باکتری *Alicyclobacillus acidocaldarius* توسط اوسوپال و همکاران (Osopale *et al.*, 2016) از آب پرتغال جداسازی شد. در پژوهشی دیگر که توسط فرانسس چینی و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد از ۲۵ نمونه رب گوجه‌فرنگی و پوره گوجه‌فرنگی، ۱۶ نمونه (۶۴ درصد) در مجموع از نظر حضور باکتری‌های *Alicyclobacillus* مثبت و ۳۶ درصد نمونه‌ها منفی بودند (Franceschini *et al.*, 2015). باکتری‌های *Alicyclobacillus* در تمامی مراحل تولید رب گوجه‌فرنگی از پوره تا محصول نهایی حضور دارند. این موضوع با پژوهشی که توسط بختیاری و همکاران (Bakhtiyari *et al.*, 2018) انجام شد، تایید گردید. همچنین در پژوهش گروین والد و همکاران (Groenewald *et al.*, 2009) نیز تایید شد. مشاهدات دیگر توسط دین هارد و همکاران در سال ۱۹۸۷ نشان داد که باکتری‌های *Alicyclobacillus acidoterrestris* در دمای کمتر از ۳۵°C و تا حدود ۵۵°C رشد می کرد و *Alicyclobacillus acidocaldarius* در دمای ۳۵°C تا بالاتر از ۵۵°C هم رشد می‌کرد (Deinhard et al., 1987). لوتیسی و همکاران (Lottici *et al.*, 2006)، گونه‌هایی از *Alicyclobacillus* را از گوجه‌فرنگی و فرآورده‌های میوه‌ای جدا کردند که گونه‌های جدا شده از فرآورده‌های گوجه‌فرنگی از نوع *Alicyclobacillus acidocaldarius* و گونه‌های جداشده از فرآورده‌های میوه‌ای *Alicyclobacillus acidoterrestris* بودند. گونه‌های *acidocaldarius* در دمای ۳۷°C، ۴۴°C، ۵۵°C و ۶۵°C رشد کردند، ولی گونه‌های *acidoterrestris* در دماهای ۳۷°C، ۴۴°C و ۵۰°C رشد کردند. همچنین نتیجه اندازه‌گیری مقاومت حرارتی نشان داد که گونه‌های جدا شده از گوجه‌فرنگی مقاومت حرارتی زیادی داشتند و D105 معادل ۱۵/۳، ۵/۰۹ و ۶/۳۴ دقیقه را نشان دادند، همچنین خصوصیات بیوشیمیایی، آزمایش‌های جوانه‌زنی اسپور در محیط‌های مختلف و مقاومت حرارتی سویه‌ها را نیز مورد بررسی قرار دادند (Lottici *et al.*, 2006). متابولیت غالب در ارتباط با باکتری *Alicyclobacillus*، گایاکول (۲-متوکسی فنل) می‌باشد که بو و طعم مشابه ترکیبات دارویی و مواد ضدعفونی کننده و همچنین بوی فنلی دارد. در مطالعه انجام شده روی سویه‌های بومی جدا شده از فرآورده های گوجه‌فرنگی ثابت شد که باکتری‌های دارای خواص ترموفیل

مانند *Alicyclobacillus acidocaldarius* در دمای ۶۵ °C و ۷۰°C رشد می‌کنند و در دمای ۳۰°C رشد نخواهند کرد (Franceschini *et al*., 2015).

در پژوهش حاضر تمامی سویه‌های جدا شده براساس انجام آزمون PCR و توالی‌یابی گونه *Alicyclobacillus acidocaldarius* تشخیص داده شد و با توجه به اینکه این باکتری در ابتدا از خاک جداسازی گردیده (Albuquerque *et al*., 2000) حضور آن در گونه های شناسایی شده این پژوهش ممکن است حاکی از آلودگی مواد اولیه به خاک باشد. همچنین توالی‌هایی با طول ۵۰۰ bp – ۴۷۱ سکانس شدند و درصد مشابهت این ایزوله‌ها با گونه‌های ثبت شده در پایگاه NCBI ۱۰۰ درصد مشخص شد. در تحقیقی که توسط گروئن والد و همکاران (Groenewald *et al*., 2009) انجام شد نتیجه توالی‌یابی قطعات ۱۱۱۹ bp –۷۷۸ در سه جدایه از خاک، بشکه‌های سرکه و پوره گلابی پیش پاستوریزه شده درصد مشابهت ۹۹ درصد– ۹۸/۹ درصد را با سویه *Alicyclobacillus acidocaldarius* نشان داد. از آنجاکه باکتری‌های *Alicyclobacillus acidocaldarius* اولین‌بار از خاک جداسازی شدند وجود این باکتری‌ها در محصول حاکی از آلودگی مواد اولیه به خاک می‌باشد. در تحقیقی که توسط دوپرادو و همکاران (Do prado *et al*., 2019) روی تاثیر اشعه UV-C بر گونه‌های *Alicyclobacillus* در آب پرتقال انجام گرفت مشخص شد که استفاده از UV-C باعث کاهش تعداد اسپور و تشکیل بیوفیلم بر روی گونه‌های تحت آزمون به‌ویژه گونه‌های *A. acidocaldarius* شده است. همچنین بختیاری و همکاران (Bakhtiyari *et al*., 2018) مشخص کردند که با توجه با مقاومت حرارتی بالای این باکتری، احتمال وجود باکتری‌های *Alicyclobacillus* در تمام مراحل تولید رب گوجه‌فرنگی وجود دارد و دمای پاستوریزاسیون ۹۵°C ± ۳°C درجه در زمان ۳۰ دقیقه در حذف کامل این باکتری موثر نمی‌باشد.

بیشتر باکتری‌های ترموفیل اسیددوست مانند خانواده Alicyclobacillus جز باکتری پاتوژن قرار نمی‌گیرند. وجود آنها در مواد غذایی ممکن است باعث بدطعم و یا بدبو شدن مواد غذایی شود ولی خطری برای سلامت مصرف‌کننده ایجاد نمی‌کند. بنابراین به‌منظور کاهش خطر فساد و به‌منظور جلوگیری از رشد اسپور باکتری در صورت وجود در فرآورده، قرار نگرفتن فرآورده به مدت طولانی در دماهای بالا از اهمیت اساسی برخوردار است. همچنین انجام خنک‌سازی سریع پس از عملیات حرارتی و نگهداری محصول دردمای کمتر از ۳۰°C درجه ضروری است. در خصوص استفاده از روش‌های مختلف مانند اشعه UV برای از بین بردن اسپورهای این باکتری به‌خصوص در فرآورده‌های اسیدی مانند رب گوجه‌فرنگی نیاز به بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تری می‌باشد که امید است در آینده مورد پژوهش قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مشترک گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیولوژی پژوهشگاه استاندارد و گروه پژوهشی منطقه ای استاندارد کرمانشاه می‌باشد. بدین‌وسیله از همکاری گروه پژوهشی میکروبیولوژی پژوهشگاه استاندارد و اداره کل استاندارد کرمانشاه تشکر و قدردانی می‌نماییم. همچنین از شرکت رژین‌تاک به عنوان کارفرمای این طرح نیز کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Albuquerque, L., Rainey, F. A., Chung, A.P., Sunna, A., Nobre, M.F., Grote, R., ... & Da Costa, M.S. (2000). *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*(2), 451-457. https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-451
2. Bakhtiyari, Sh., Edalatian Dovom, M.R., Habibi Najafi, M.B., & Yavarmanesh, M. (2018). Isolation and identification of *Alicyclobacillus* spp. from different steps in the production line of tomato paste using culture-dependent and molecular methods and Evaluation of brix effecton Alicyclobacillus growth, *Food Science and Technology*, *15*(9), 421-435.
3. Berry, R.N. (1933). Some new heat resistant, acid tolerant organisms causing spoilage in tomato juice. *Journal* of *Bacteriology*, *25*(72).
4. Baumgart, J., Husemann, M., & Schmidt, C. (1997). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: occurrence, significance and detection in beverages and beverage base. *Flussiges Obst*, *64*, 178–180.
5. Baumgart, J. (2003). Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. In *Progress in Industrial Microbiology*, *37*, 161-166. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80014-0
6. Berkeley, R.C.W., & Ali, N. (1994). Classification and identification of endospore-forming bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, *76*, 1S-8S.

7. Chang, S.S., & Kang, D.H. (2004). *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology*, *30*(2), 55-74. https://doi.org/10.1080/10408410490435089`
8. Cocconi, E., Franceschini, B., & Previdi, M. P. (2018). Identification of spoilage by Alicyclobacillus bacteria in tomato-based products by UHPLC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, *53*(9), 903-910. https://doi.org/10.1002/jms.4270
9. Cerny, G., Hennlich, W., & Poralla, K. (1984). Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganism. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, *179*, 224-227.
10. Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., & Altan, E. (1987). Bacillus acidoterrestris sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Systematic and Applied Microbiology*, *10*(1), 47-53. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(87)80009-7
11. Do Prado, D.B., dos Anjos Szczerepa, M.M., Capeloto, O.A., Astrath, N.G.C., Dos Santos, N.C.A., Previdelli, I.T.S., ... & de Abreu Filho, B.A. (2019). Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and biofilms of *Alicyclobacillus* spp. in industrialized orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, *305*, 108238. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108238
12. Durak, M.Z., Churey, J.J., Danyluk, M.D., & Worobo, R.W. (2010). Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, *142*(3), 286-291. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.003
13. Franceschini, B., Manganelli, E., Bloise, C., & Previdi, M. P. (2015). Tomato products spoilage by *Alicyclobacillus* spp: growing ability of spores naturally present as a function of the total soluble solids and isolates characterization. *Journal Food Process Beverages*, *3*(1), 6.
14. Goto, K., Mochida, K., Kato, Y., Asahara, M., Fujita, R., An, S.Y., ... & Yokota, A. (2007). Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *Alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(6), 1276-1285. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64692-0
15. Goto, K., Nishibori, A., Wasada, Y., Furuhata, K., Fukuyama, M., & Hara, M. (2008). Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards. *Letters in Applied Microbiology*, *46*(3), 289-294. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02307.x
16. Groenewald, W. H., Gouws, P. A., & Witthuhn, R. C. (2009). Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology*, *26*(1), 71-76. https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.008
17. INSO 2326, (2016). Microbiology of Canned foods- Commercial sterility- Specifications and test methods.
18. INSO 761, (2016). Canned tomato paste-Specifications and Test Methods.
19. ISO 11133, (2014). Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
20. Lee, S.Y., Ryu, S.R., & Kang, D.H. (2010). Treatment with chlorous acid to inhibit spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in aqueous suspension and on apples. *Letters in Applied Microbiology*, *51*(2), 164-169. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02874.x
21. Lottici, C., Previdi, M.P., & Bolzoni, L. (2006). Characterization and study of alicyclobacilli isolated from tomato products [vegetable and fruit products; biological contamination]. *Industria Conserve (Italy)*.
22. Osopale, B.A., Witthuhn, C.R., Albertyn, J., & Oguntoyinbo, F.A. (2016). Culture dependent and independent genomic identification of *Alicyclobacillus* species in contaminated commercial fruit juices. *Food Microbiology*, *56*, 21-28. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.014
23. Karavaiko, G.I., Bogdanova, T.Y.I., Tourova, T.Y.P., Kondrat'eva, T.F., Tsaplina, I.A., Egorova, M.A., ... & Zakharchuk, L.M. (2005). Reclassification of '*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans'* strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(2), 941-947. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63300-0
24. Pettipher, G.L., Osmundson, M.E., & Murphy, J.M. (1997). Methods for the detection and enumeration of Alicyclobacillus acidoterrestris and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology*, *24*(3), 185-189. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00373.x
25. Splittstoesser, D.F. (1998). Control of Alicyclobacillus in the juice industry. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, *18*, 585-587.
26. Yokota. A., Fujii, T., & Goto, K. (2007). *Alicyclobacillus*. Springer, New York.

27. Walls, I., & Chuyate, R. (2000). Isolation of Alicyclobacillus acidoterrestris from fruit juices. *Journal of AOAC International*, *83*(5), 1115-1120. https://doi.org/10.1093/jaoac/83.5.1115
28. Uchino, F., & Doi, S. (1967). Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agricultural and Biological Chemistry*, *31*(7), 817-822. https://doi.org/10.1080/00021369.1967.10858890
29. Walls, I. (1998). Alicyclobacillus-historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy Food Environ. Sanitation*, *18*, 499-503. https://doi.org/10.1080/10408410490435089
30. Wisse, C.A. (1998). Isolation and enumeration of sporeforming, thermo-acidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. *Dairy Food Environment Sanitation*, *18*, 504-509. https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80014-0Get rights and content
31. Wang, Z., Wang, J., Yue, T., Yuan, Y., Cai, R., & Niu, C. (2013). Immunomagnetic separation combined with polymerase chain reaction for the detection of Alicyclobacillus acidoterrestris in apple juice. *PloS One*, *8*(12), e82376. https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80014-0